

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520101153306

UDC _____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

靶向调控 TGF- β 1/smad3 信号通路活性
逆转肝癌干细胞多药耐药性

Targeting TGF- β 1/smad3 Signal Pathways activity in
Cancer Stem Cells to reverse Multi-drug Resistance

文 霆

指导教师姓名: 吴国洋 教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 05 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

背景及目的 导致肝癌治疗失败、肿瘤复发和转移的原因之一是肿瘤耐药性的产生。肿瘤干细胞被认为是肿瘤化疗失败并产生多药耐药性的罪魁祸首。然而肿瘤干细胞与肿瘤耐药之间的相关性，以及针对肝癌化疗中多药耐药性寻找新的治疗策略仍然是个急需解决的重大难题。本研究的目的是应用抗癌药物阿霉素（ADM）诱导建立人肝癌多药耐药细胞 Huh7.5.1/ADM,通过检测多药耐药细胞、亲本细胞和 TGF- β 1/smad3 抑制剂 SIS3 处理耐药细胞的 CD133 和 TGF- β 1/smads 信号通路的变化，初步探讨 TGF- β 1/smads 信号通路是否可作为逆转肝癌干细胞多药耐药性的靶点。

实验方法 采用药物浓度梯度递增诱导法诱导亲本细胞建立人肝癌多药耐药细胞系 Huh7.5.1/ADM,流式细胞仪分析细胞凋亡并检测干细胞表面标志物 CD133。平板克隆实验观察肿瘤干细胞的生长情况。裸鼠成瘤实验验证肿瘤干细胞成瘤能力。WB 检测 Huh7.5.1, Huh7.5.1/ADM,和加入抑制剂 sis3 的耐药细胞株的 CD133,smad3 和 磷酸化 smad3 的表达,并用 CCK8 分别检测其耐药性。

结果 应用 ADM 成功诱导建立的人肝癌多药耐药细胞 Huh7.5.1/ADM,具有肝癌干细胞特性和对多种化疗药物的耐药性。通过 western blot 分析耐药细胞株与亲本细胞蛋白的改变，寻找耐药细胞株对多种化疗药物产生耐药的机制后，用 SIS3 抑制 TGF- β 1/smad3 信号通路，抑制多药耐药细胞株 Huh7.5.1/ADM 干细胞活性，逆转了其多药耐药性。

结论 TGF- β 1/smad3 信号通路抑制剂 SIS3 具有靶向逆转肝癌多药耐药细胞多药耐药性的作用

关键词：肝癌干细胞 多药耐药性 CD133 TGF- β 1/smad3 SIS3

Abstract

Background & Aims Treatment failure in hepatocellular carcinoma (HCC) leading to local recurrence(s) and metastases is mainly due to drug resistance. Cancer stem cells (CSCs) are thought be responsible for the development of drug resistance. However, the correlations between CSCs, drug resistance, and new strategy against drug resistance in HCC remain elusive. The aim of this study was to establish Huh7.5.1/ADM cell line by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of adriamycin(ADM), then detect the expression of CD133 and the change of TGF- β 1/smads pathway in HCC MDR cells and parental cell. Intending to provide the theoretical instructions for reverse of HCC MDR by targeting TGF- β 1/smad3 signal pathway.

Methods MDR HCC cell lines, Huh7.5.1/ADM were developed by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of ADM. Flow cytometry was employed to analyze cell cycle distribution and measure expression of CD133. Hepatocellular carcinoma mouse xenografts were examined for the tumorigenicity of Hepatocellular carcinoma cells. Express CD133, smad3 and p-smad3 were analyzed by Western blot. Using TGF- β 1 inhibitor SIS3 to incubate the resistant cell Huh7.5.1/ADM, and then detected resistance by CCK8.

Results CCK8 assay showed that Huh7.5.1/ADM were resistant not only to ADM, but also to multiline anticancer drugs. By western blot analysis of drug resistant cell lines and parental cells protein change, we gain multi-drug resistance mechanisms of resistant cell lines to variety of chemotherapeutic drugs. Then SIS3 targets TGF- β 1/smad3 Signal Pathways active in Cancer Stem Cells to suppress Stem cell properties and reverse Multi-drug Resistance.

Conclusions SIS3 targets TGF- β 1/smad3 Signal Pathways active in Cancer Stem Cells to reverse Multi-drug Resistance in vivo and vitro.

Keywords: CSCs CD133 MDR TGF- β 1/smad3 SIS3

厦门大学博士论文摘要库

目 录

前 言	1
第一章 人肝癌多药耐药干细胞模型的建立及鉴定	7
一、材料和方法	7
二、结果与分析	11
三、讨论	13
四、小结	14
第二章 SIS3 抑制肿瘤干细胞多药耐药性的机制研究	15
一、材料和方法	15
二、结果与分析	20
三、讨论	23
四、小结	24
第三章 SIS3 体内抑制肝癌多药耐药细胞皮下移植瘤生长的实验研究	25
一、材料和方法	25
二、结果与分析	28
三、讨论	29
四、小结	30
结 论	31
统计学方法	32
参考文献	33
综 述	37
致谢	45

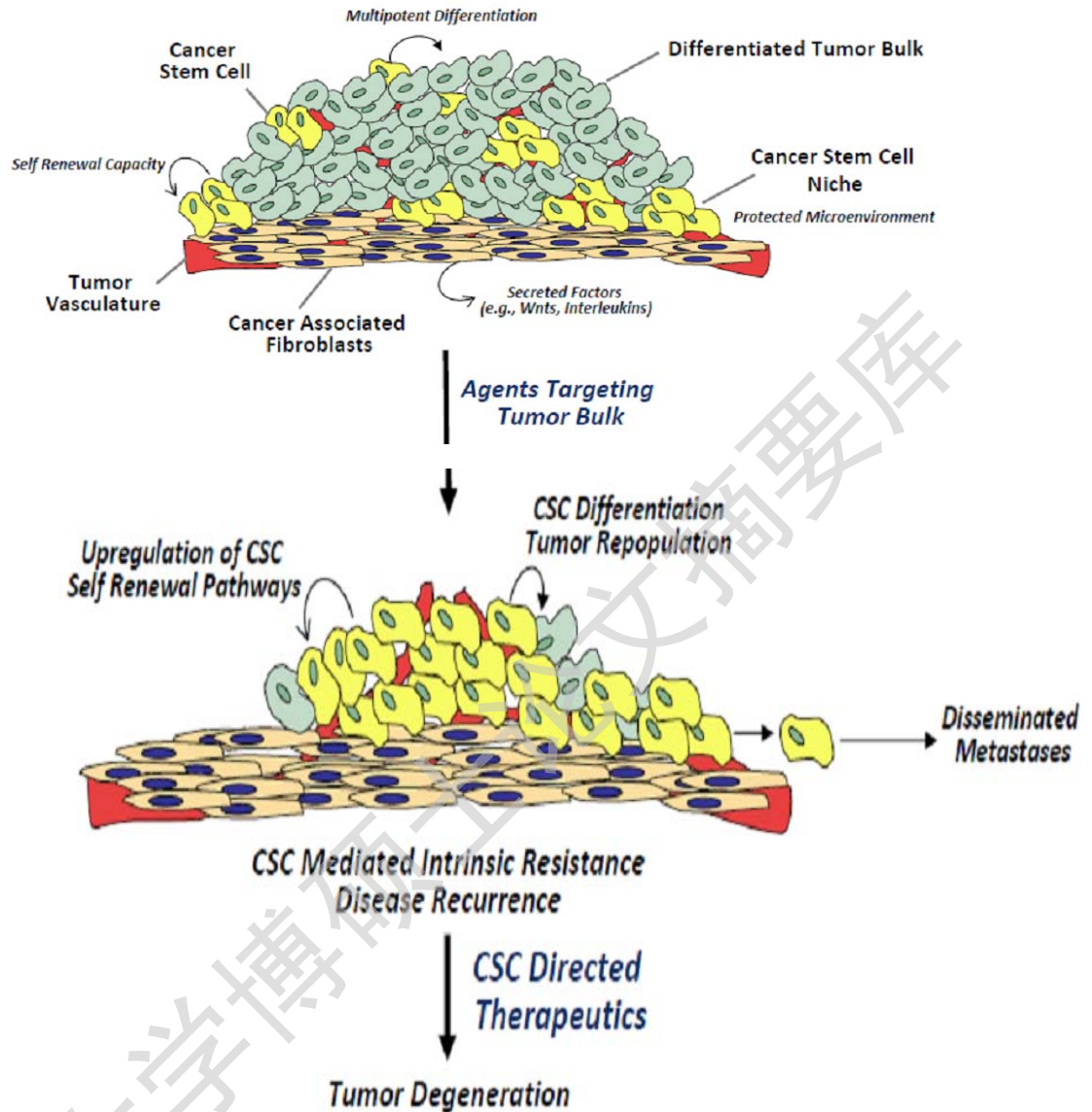
Table of Contents

Introduction.....	1
Part I Establish and identification of multi-drug resistance model	
of liver cancer stem cell	7
Materials and methods	7
Results	11
Discussion.....	13
Brief summary of Part I	14
Part II The mechanism of SIS3 inhibiting multi-drug resistance of	
liver cancer stem cell.....	15
Materials and methods	15
Results	19
Discussion.....	22
Brief summary of Part II.....	23
Part III Effect of SIS3 on subcutaneous xenotranplanted tumor.....	25
Materials and methods	25
Results	28
Discussion.....	29
Brief summary of Part III.....	30
Conclusion	31
Statistical Methods.....	32
References	33
Reviews.....	37
Acknowledgements	45

前 言

一、肝细胞癌

近年来，肿瘤的发病率逐年升高，传统的治疗手段虽然可以在一定程度上抑制肿瘤的生长，但是对于肿瘤复发、转移等难题没有行之有效的办法。肿瘤干细胞假说将肿瘤研究的重点引向一小部分具有特殊性质的肿瘤细胞，这类细胞对肿瘤复发、转移、抗药性以及永生化研究具有重要意义^[1,2]。肿瘤干细胞的研究日益引起人们的关注，肿瘤干细胞与肿瘤的发生、发展以及耐药关系密切^[3-5]。肿瘤干细胞耐药性的发生，使肿瘤治疗的效果得不到显著提高^[6]。而 CD133 作为肿瘤干细胞表面的一种标志物，为我们探索肿瘤干细胞生物活性和多药耐药机制提供了一个很好的支点^[7]。原发性肝癌，简称肝癌，主要是肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC），是世界上最常见的恶性肿瘤之一，发展速度快，恶性程度高，极易转移及复发^[8]。目前肝癌的治疗手段主要是肝切除术，化疗是肝癌辅助治疗的重要方法之一，然而肝癌的多药耐药(multiple drug resistance, MDR)已成为制约化疗效果及影响患者生存的主要难点^[9]。肿瘤干细胞理论的提出，为逆转肝癌多药耐药性，提供了新的治疗突破口，有研究证明：肝癌干细胞与肿瘤的发生及治疗关系密切。肝癌干细胞耐药性的发生，使肝癌治疗的效果得不到显著提高。传统的化疗，只是杀死了肿瘤细胞，而肿瘤干细胞通过自我更新、处于静止期、逃逸化疗药物毒副作用等潜能，不被杀死，成为后期肝癌转移和复发的罪魁祸首。所以在治疗肝癌原发病灶时，我们也同时需要针对肝癌干细胞靶向治疗，抑制肿瘤对化疗药物的耐药性，来减少肝癌的复发和转移，以提高肝癌的生存率。



肿瘤干细胞逃逸治疗引起肿瘤复发

二、肿瘤干细胞（CSC）

癌干细胞，也称肿瘤干细胞(carcer stem cell,CSC)是近年来生物医学刊物出现频率较高的一个新词汇，应该是指癌组织中“存在的”为数不多的具有自我更新能力、分化潜能的细胞。

2.1 癌干细胞的特征

2.1.1 自我更新

自我更新(self-renewal)是指一个细胞分裂为两个细胞,但其中一个子代细胞仍然保持与亲代细胞完全相同的未分化状态;而另一个子代细胞则定向(commit)

分化, 这种分裂称为不对称分裂(dissymmetric division)。癌干细胞与成体干细胞类似, 也应具有自我更新的特性。认识正常干细胞自我更新的调节机制是理解肿瘤细胞增殖机制的基础, 因为癌通常被认为是自我更新失控所致的疾病。有人认为肿瘤干细胞自我更新的特性是造成肿瘤复发、转移及预后不良的主要原因^[10]。正常干细胞通过不对称分裂在实现自我更新的同时, 也通过分化、细胞周期的有序进行, 为机体在生命过程中维持恒态(homeostasis)起了不可替代的作用。不同组织中干细胞究竟是自我更新还是向特定细胞分化取决于干细胞的内在能力及其 niche 细胞的作用。肿瘤干细胞通过自我更新维持着肿瘤的持续生长。肿瘤干细胞积累了所在肿瘤的基因突变, 正是这些基因突变导致了肿瘤细胞的过度增殖, 乃至转移播散。

2.1.2 高致瘤性

癌干细胞的致瘤性因肿瘤种类不同差别较大, 主要从两个方面进行评价: 一是癌干细胞的体外克隆形成(clonogenicity)能力, 即源自原发性肿瘤组织或肿瘤细胞系的癌干细胞在软琼脂(soft agar)或基底膜类似物(matrigel)上形成克隆数及其大小; 二是癌干细胞在免疫缺陷动物体内的肿瘤形成(tumorigenicity)能力, 即将分选的相同数量的癌干细胞和非干细胞分别原位或异位接种免疫缺陷动物, 观察其在相同时间内成瘤情况(统计成瘤动物数, 比较形成肿瘤的大小等)。实验结果支持癌干细胞比癌非干细胞具有更高的成瘤潜能^[11]。

2.1.3 分化潜能

分化潜能(differentiation potential)也是癌干细胞的重要特征之一。癌干细胞在体外及体内应具有分化的能力, 其子代细胞应呈现分化特征的表型及其相应的标志。以肝病为例, 肝癌的干细胞理应分化成具有 AFP、albumin、CK8、CK18、CK7、CK19 等肝脏细胞(肝细胞或胆管细胞)分化标志物的癌细胞^[12]。

2.1.4 耐药性

耐药性(drug resistance)是癌干细胞的特性之一, 因而不少报道认为癌干细胞的存在是导致肿瘤化疗失败的主要原因。正常情况下, 多数耐药分子, 如 P-glycoprotein、MRP1、MRP2 及 Bcrp1/ABCG2 (ATP-binding cassette transporter G2, ABCG2)在营养吸收的器官组织(如肺、消化道)、代谢和排泄器官组织(肝、肾)等的上皮细胞均有不同程度的表达, 同时这些运输分子在维持体内的生理屏

障 (血脑屏障、血脑脊髓液屏障、血睾屏障、母体-胎儿屏障及胎盘)具有重要作用^[13]。因此, 这些 ATPbindingcassette (ABC) transporters 具有调节吸收、营养分布、代谢、分泌和外源毒性物质的功能。肿瘤干细胞膜上多数表达 ABC transporter 家族膜蛋白, 这类蛋白大多可运输并外排包括代谢产物、药物、毒性物质、内源性脂类物质、多肽、核苷酸及固醇类等多种物质, 使许多对肿瘤非干细胞具有抑制或杀伤作用的化疗药物却对肿瘤干细胞杀伤作用明显减弱^[14]。Bcrp1/ABCG2 是目前研究常用的癌干细胞耐药靶标。该领域的突破性研究进展可能会开发出新型肿瘤化疗策略。

三、CD133 与肿瘤干细胞的鉴定

对于肿瘤干细胞细胞亚群的认识源于对其表面标志分子的认识, 最初界定肿瘤干细胞和非肿瘤干细胞的方法是利用肿瘤干细胞表面特异性的标志分子, 而 CD133 作为一种常见的肿瘤干细胞标志分子。CD133 是表达于造血干细胞以及肿瘤干细胞表面的标志分子。人类 CD133 蛋白最初是在人造血干细胞细胞膜表面利用 AC133 单克隆抗体鉴定出来的, 因此有时也称为 AC133, 与鼠的 Prominin-1 蛋白同源。人类 CD133 基因位于第 4 号染色体, 全长 150 kb, 包含 37 个外显子。成熟的人类 CD133 蛋白为 120 kDa 的五次跨膜糖蛋白, 包含两个较大的胞外区域和两个富含半胱氨酸的胞内环状结构。通过 5' RACE 分析出人类 CD133 具有至少 7 个 5'-UTR 亚型的转录本, 并且具有组织特异性。具有组织特异性的人类 CD133 启动子的识别, 为分离干细胞提供了一个切实可行的方法^[15]。利用肿瘤干细胞具有对于放化疗的抗性鉴定早在 2002 年 Guzman 等^[16]就发现了白血病干细胞比其他分化了的白血病细胞具有更强的耐药性。Yu 等^[17]利用抗肿瘤药物筛选从恶性脑胶质瘤细胞系 U87MG 中鉴定并分离出来了肿瘤干细胞。Nakai 等^[18]了在恶性脑胶质瘤中肿瘤干细胞高表达抗药基因 MDR1 和 CD133, 并发现这类细胞对多种抗癌药物都有不同程度的抗药性。James 等^[31]现过表达 CD133 的大鼠 C6 脑胶质瘤细胞对于抗肿瘤药物喜树碱和阿霉素所引起的细胞凋亡有明显的抵抗作用。Houghton 等^[32]研究胃癌时提出肿瘤干细胞的抗药性主要来源于其在细胞周期中的特殊性, 由于肿瘤干细胞本身增殖能力较弱, 所以大部分针对细胞周期的化疗药物以及射线对肿瘤干细胞没有明显效果, 而且 DNA 停留在 G0 期也有利于细胞对自身 DNA 进行修复, 将药物和射线的

伤害降到最低。肿瘤干细胞内活性氧成分比较低,清除自由基的能力比较强,使得肿瘤干细胞对于放疗具有抗性^[33]。抗性对于肿瘤干细胞的鉴定比较直接,大部分肿瘤细胞对放化疗不具有抗性,通过药物或射线筛选和可以得到具有抗性的肿瘤细胞,这类肿瘤细胞经体外培养,可以形成具有干细胞性质的细胞克隆。

四、TGF- β 1/smad3 信号通路

TGF- β 1 信号通路和肝癌干细胞与肝癌发生发展关系密切,TGF- β 1 信号通路在恶性肿瘤中的研究是肿瘤信号转导领域的一大热点。现代肿瘤分子生物学研究表明,TGF- β 1 是一种多功能性的细胞因子,广泛参与了组织器官的形成、细胞增殖、凋亡、分化等多种生物学过程^[19]。TGF- β 1 信号的传递主要通过 Smads 途径和非依赖 Smads 的途径。在早期,对肿瘤的生长呈抑制作用,通路中任一元件发生突变都将会传递信号,使细胞逃避 TGF- β 1 介导的生长抑制作用,从而具有选择性生长优势,导致肿瘤的发生与发展。但对于进展期和晚期肿瘤呈促进作用,并能增强其侵袭力和恶性程度^[20]。Smads 蛋白家族是 TGF- β 1/Smads 信号通路中重要成员,包括 Smad 1~9,它们都存在于胞质中,作用是将 TGF- β 1/Smads 信号转导入核内并参与 TGF- β 1 靶基因的调节。Ohmori 等^[21]在研究乳腺癌化疗耐药发现顺铂作用乳腺癌 MDA-231 细胞后,乳腺癌细胞 TGF- β 1 mRNA 水平会持续高表达并分泌有活性的 TGF- β 1。当用 TGF- β 1 中和性抗体阻断肿瘤细胞 TGF- β 1 的活性时则会加速细胞周期的进展,并使乳腺癌细胞对化疗产生较高的敏感性。TGF- β 1/Smads 信号转导通路在肝细胞性肝癌的发生发展中具有重要作用,广泛参与了肝癌细胞的增殖、凋亡以及侵袭转移等多种生物学过程的调节^[22]。在肝脏中,TGF- β 1 在慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化及肝癌的进展过程中扮演着重要的角色^[23]。但其在肝癌的发生及进展中的作用仍不明确。Abou-Shady^[24]和 Matsuzaki 等^[25,26]研究表明 TGF- β 1 在早期肝癌患者表达水平降低,但在晚期肝癌患者却表达增高。肝癌干细胞在肝癌病人的预后及生存方面有着重要的作用。Song 等^[27]发现肝癌患者肝癌组织中 CD133⁺细胞的比例越高,患者的血清 AFP 就越高,肿瘤的病理分级及预后就会越差。Yang^[28]和 Sasaki^[29]等研究也表明肝癌患者若高表达 CD133 等干细胞标记,病人的预后就越差。Tang 等^[30]研究提示 TGF- β 1 信号通路的失调可能通过影响肝癌干细胞而导致了肝癌的发生。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库